

HTLV BLOT 2.4

TEST PAR WESTERN BLOT

CE
0123

DATE DE RÉVISION : 05/05
MAK 0011-FRA-0

Remarque: modifications en surbrillance.

REF (trousse de 18 tests) : 11080-018
(trousse de 36 tests) : 11080-036

NOM ET APPLICATIONS

Le test **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics (MPD)** est un test enzymatique qualitatif destiné à la détection *in vitro* des anticorps anti-HTLV-I et HTLV-II dans le sérum ou le plasma humain. Il est prévu pour être utilisé comme test complémentaire plus spécifique sur les prélèvements de sérum ou de plasma humain ayant montré une réaction positive reproductible aux procédures de dépistage de type test par immunoadsorption avec enzyme conjugué (ELISA).

INTRODUCTION

Les récentes études épidémiologiques menées aux États-Unis et en Europe confirment l'existence d'une prévalence mixte de chacun des deux virus HTLV-I et HTLV-II au sein de diverses populations à risque élevé, tels que les consommateurs de drogue par voie intraveineuse. Les tests de dépistage des virus HTLV-I/II sont largement disponibles. Les prélèvements montrant une réaction positive reproductible aux tests de dépistage doivent être soumis à des tests complémentaires plus spécifiques afin de confirmer leur séropositivité au HTLV-I ou au HTLV-II. Ces tests complémentaires doivent être en mesure d'identifier les anticorps dirigés contre les protéines de la nucléocapside *(gag)* et de l'enveloppe *(env)* des virus HTLV-I et HTLV-II. Les bandelettes de Western Blot comprenant des antigènes viraux natifs du HTLV-I constituent l'un de ces tests complémentaires couramment utilisés. Toutefois, en raison de l'absence d'antigène natif de l'enveloppe dans le test du Western Blot HTLV-I traditionnel, il est souvent nécessaire de recourir à des méthodes de radio-immunoprécipitation pour confirmer plus précisément la présence d'anticorps anti-HTLV-I/II. La discrimination des séropositifs au HTLV-I et HTLV-II nécessite l'emploi de tests complémentaires (à savoir de peptide spécifique, de tests ELISA, de réaction ACP).

Il est donc nécessaire de recourir à des tests sérologiques complémentaires simples et néanmoins spécifiques et sensibles pour obtenir une confirmation et une différenciation rapides des échantillons séropositifs au HTLV-I et au HTLV-II.

Le test **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics** a permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la confirmation comme de la différenciation des cas de séropositivité au HTLV-I et au HTLV-II. Ceci a été rendu possible par l'intégration de MTA-1, protéine recombinante unique de l'enveloppe du HTLV-I (rgp46-I), de K55, protéine recombinante unique de l'enveloppe du HTLV-II (rgp46-II) et de GD21, protéine recombinante de l'enveloppe du HTLV-I et du HTLV-II, épitope courant et néanmoins spécifique. Chaque bandelette comporte également un contrôle interne ajouté à l'échantillon permettant de limiter au maximum les risques de faux négatifs liés aux erreurs de manipulation.

Le test **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics** est prévu pour être utilisé comme test à anticorps complémentaire afin d'analyser les échantillons ayant montré une réaction positive reproductible aux tests de dépistage initiaux du HTLV-I/II. Les profils sérologiques pouvant être mis en évidence par le test **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics** sont les suivants : séropositif au HTLV, séropositif au HTLV-I, séropositif au HTLV-II, séronégatif ou indéterminé.

DESCRIPTION DES SYMBOLES UTILISÉS

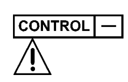
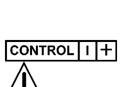
Il s'agit des symboles graphiques utilisés sur les produits et emballages des produits diagnostiques de **MP Diagnostics**. Ce sont les symboles apparaissant le plus fréquemment sur les équipements médicaux et sur leurs emballages. Ils sont décrits plus en détails dans la notice de normalisation "British and European Standard" BS EN 980: 2003.

	Utiliser avant *Synonyme :* Date de péremption	IVD	Équipement médical à usage diagnostique in vitro
LOT	Code du lot de fabrication *Synonymes :* Numéro de lot Numéro de lot de fabrication	REF	Numéro du catalogue
			Attention ! Voir les instructions d'utilisation
	Limites de température		
	Fabricant	EC REP	Représentant agréé dans la Communauté européenne
	Contenance suffisante pour <n> tests		Consulter les instructions d'utilisation
	Ne pas réutiliser		

PRINCIPES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DU TEST

Des protéines virales HTLV-1 issues de particules virales dissociées, inactivées et natives, ainsi que des protéines conçues génétiquement sont intégrées aux bandelettes de nitrocellulose. Les bandelettes de nitrocellulose sont mises à incuber avec les prélèvements plasmatiques ou sériques dilués et les contrôles. Les anticorps spécifiques au HTLV-I/II, s'ils sont présents dans le prélèvement, se lient alors aux protéines de HTLV-I/II des bandelettes. Les bandelettes sont lavées afin d'éliminer les substances non liées et les anticorps se liant spécifiquement aux protéines HTLV peuvent être visualisées à l'aide d'une série de réactions aux anticorps de chèvre anti-IgG humaine conjugués à la phosphatase alcaline, et du substrat à base de BCIP/NBT. Cette méthode est suffisamment sensible pour permettre de détecter des quantités marginales d'anticorps anti-HTLV dans le sérum ou le plasma.

ÉLÉMENTS DE LA TROUSSE

	Description du contenu	Quantité fournie
ANTIGEN STRIPS	**BANDELETTES DE NITROCELLULOSE** Comporte un lysat viral de HTLV-I, des antigènes d'enveloppe recombinants et une bandelette (anti-IgG humaine) de contrôle de dépôt sérique. Conserver au sec et à l'abri de la lumière.	Disponible par 18 et 36 bandelettes
CONTROL – 	**CONTRÔLE NÉGATIF** Sérum humain normal inactivé non réactif aux anti-VHC, anti-VIH-1/2, anti-HTLV-I/II et AgHBs. Contient de l'azide de sodium et du thiomersal comme conservateurs.	1 flacon (80 µl)
CONTROL I + 	**CONTRÔLE POSITIF FORT I** Sérum humain inactivé à fort titrage en anticorps anti-HTLV-I et non réactif aux anti-VHC, anti-VIH-1/2 et AgHBs. Contient de l'azide de sodium et du thiomersal comme conservateurs.	1 flacon (80 µl)
CONTROL II + 	**CONTRÔLE POSITIF FORT II** Sérum humain inactivé à fort titrage en anticorps anti-HTLV-II et non réactif aux anti-VHC, anti-VIH-1/2 et AgHBs. Contient de l'azide de sodium et du thiomersal comme conservateurs.	1 flacon (80 µl)
BUF LYO. STOCK	**TAMPON DE STOCKAGE LYOPHILISÉ** À reconstituer avec de l'eau de qualité réactif. Tampon Tris avec protéines animales et non animales inactivées par la chaleur. Contient du thiomersal comme conservateur.	1 ou 2 bouteilles (chacune devant être reconstituée à hauteur de 100 ml)
BUF WASH 20x T	**TAMPON CONCENTRÉ DE LAVAGE (20x)** Tris associé au Tween-20 et contenant du thiomersal comme conservateur.	1 bouteille (70 ml)
CONJUGATE	**CONJUGUÉ** Anti-IgG humain de chèvre conjugué à de la phosphatase alcaline.	1 flacon (120 µl)
SUBS BCIP / NBT ⚠	**SUBSTRAT** Solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) et de nitrobleu de tétrazolium (NBT).	1 bouteille (100 ml)
POWDER BLOTTING	**POUDRE DE BLOTTING** Lait écrémé déshydraté	10 sachets (1 g chacun)
	Plaques d'incubation de 9 puits chacune	2 ou 4 plaques
	Mode d'emploi	1 exemplaire
	Pinces	1 pièce

Remarque: Le volume de réactifs fourni permet de réaliser 4 cycles.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

1. Utilisation réservée au diagnostic *in vitro*.
2. Utilisation réservée aux professionnels.
3. Consulter l'emballage du produit pour connaître les composants susceptibles de présenter un risque biologique.

INFORMATIONS RELATIVES À LA SÉCURITÉ ET LA SANTÉ



ATTENTION : Cette trousse contient des substances d'origine humaine. Aucune technique de test ne permet de garantir totalement que les produits sanguins humains ne sont pas susceptibles de transmettre une infection.

MANIPULER LES PRÉLÈVEMENTS À TESTER, LES CONTRÔLES POSITIFS FORTS I ET II, ET LES CONTRÔLES NÉGATIFS COMME S'IL S'AGISSAIT D'AGENTS POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Il est recommandé de manipuler les composants et les spécimens à analyser conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire. Ils doivent également être éliminés dans le respect des règles de sécurité en vigueur.

Les ***contrôles positifs forts I et II et le contrôle négatif*** contiennent du thiomersal et de l'azide de sodium tandis que le tampon concentré de stockage et le tampon concentré de lavage contiennent du thiomersal et le conjugué, de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir au contact du cuivre et du plomb présents dans certaines tuyauteries et former des sels explosifs. Les quantités utilisées dans cette trousse sont limitées. Toutefois, lors de leur élimination, les substances contenant des azides doivent être rincées abondamment afin d'éviter la formation d'azides métallisés dans les tuyauteries. (Ci-après figurent les énoncés des dangers (R) correspondants.)

R20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion

Le ***substrat*** contient du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate et du nitrobleu de tétrazolium, lequel est classé comme nocif (Xn) par les directives applicables de la Communauté Européenne (CEE). (Ci-après figurent les énoncés des dangers (R) correspondants.)

R20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

1. Éviter toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons ou bouteilles et de l'extraction d'échantillons de produit.

2. Ne pas pipeter à la bouche.

3. Manipuler les prélèvements à tester, les bandelettes de nitrocellulose, les contrôles positifs forts I et II et les contrôles négatifs comme l'exigent les agents potentiellement infectieux.

4. Porter une blouse de laboratoire et des gants jetables pendant le déroulement du test. Jeter les gants dans des sacs poubelle destinés aux matériaux présentant un risque biologique. Se laver abondamment les mains par la suite.

5. Il est fortement recommandé de procéder à ce test dans un local prévu pour les opérations à risque biologique.

6. Ne pas placer d'aliments ni de boissons à proximité des produits.

7. En cas d'accident ou de contact avec les yeux, rincer immédiatement à grande eau et consulter un médecin.

8. Consulter immédiatement un médecin en cas d'ingestion de substances contaminées ou de mise en contact avec des plaies ouvertes ou autres lésions cutanées.

9. Essuyer immédiatement les éclaboussures de substances potentiellement infectieuses à l'aide de papier absorbant et nettoyer la zone contaminée à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % avant de reprendre le travail. L'hypochlorite de sodium ne peut être utilisé sur les éclaboussures contenant de l'acide que si la zone a préalablement été essuyée et séchée à l'aide de papier absorbant. Le matériel utilisé (y compris les gants jetables) doit être éliminé comme les matériaux susceptibles de présenter un risque biologique. Ne pas autoclaver les matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.

10. Autoclaver tous les matériaux utilisés et contaminés à 121°C (15 p.s.i.) pendant 30 minutes avant de les évacuer. Il est également possible de décontaminer les matériaux dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % pendant 30 à 60 minutes avant de les éliminer dans des sacs poubelle pour produits à risque biologique.

11. Décontaminer tous les produits chimiques et réactifs utilisés en y ajoutant le volume d'hypochlorite de sodium nécessaire pour arriver à une concentration finale d'au moins 1 %. Laisser en contact pendant 30 minutes pour garantir le succès de la décontamination.

12. Il est déconseillé de réutiliser les plaques d'incubation.

PRÉCAUTIONS ANALYTIQUES

1. Le fonctionnement optimal du test n'est possible que dans le **RESPECT ABSOLU** du mode opératoire décrit dans ce mode d'emploi. Le non-respect de ce mode opératoire peut entraîner l'obtention de résultats aberrants.

2. **NE PAS MODIFIER OU ÉCHANGER DES RÉACTIFS DE TROUSSES DIFFÉRENTES.** L'assemblage des contrôles, conjugué et bandelettes de Western Blot est étudié pour un fonctionnement optimal. Utiliser uniquement les réactifs fournis avec la trousse.

3. Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption figurant sur l'emballage de la trousse.

4. Éviter toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons ou bouteilles et de prélèvements de produit. Une contamination réduirait la durée de conservation des trousses et entraînerait l'obtention de résultats erronés. Utiliser des procédés aseptiques, notamment les pipettes ou les embouts jetables de pipette, lors de prélèvements dans les flacons.

5. Les contrôles de la trousse doivent être testés en même temps que les échantillons des patients à chaque cycle de test.

6. Afin d'éviter toute contamination croisée, utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque nouvel échantillon.

7. Pour obtenir des résultats optimaux, verser les réactifs encore froids et les replacer le plus rapidement possible entre 2°C et 8°C pour conservation.

8. Il est recommandé de nettoyer la verrerie devant être utilisée avec les réactifs à l'aide d'acide chlorhydrique à 2 M et de la rincer abondamment à l'eau distillée ou désionisée avant utilisation.

9. Utiliser exclusivement de l'eau désionisée ou distillée de qualité réactif pour diluer les réactifs.

10. Tous les réactifs doivent être convenablement mélangés avant utilisation.

11. La solution de conjugué de travail, le tampon de lavage dilué et le tampon de blotting doivent être préparés juste avant utilisation.

12. La solution de conjugué de travail doit être préparée à l'aide d'un bécher ou d'un récipient en polypropylène.

13. Ne pas manipuler les réactifs dans une zone contenant un niveau élevé de vapeurs désinfectantes chimiques (par exemple, les vapeurs d'hypochlorite) au cours de leur conservation ou de l'incubation, et ne pas effectuer le test dans une telle zone. La mise en contact inhibe la réaction de coloration. Ne pas exposer non plus les réactifs à une forte luminosité.

14. Il est préférable d'effectuer le test à température ambiante (25°C ± 3°C).

15. Veiller à ce que les bandelettes de test soient disposées de façon à ce que les numéros inscrits sur les bandelettes soient dirigés vers le haut.

16. Pour le test de Western Blot, il est important d'utiliser un agitateur à bascule et non un agitateur rotatif. Dans le cas contraire, le fonctionnement de la trousse serait compromis. La vitesse et l'angle d'inclinaison recommandés pour l'agitateur sont respectivement de 12 à 16 cycles par minute et de 5 à 10 degrés.

17. Avant utilisation, vérifier que les équipements automatisés, s'ils sont utilisés, sont validés.

18. Veiller à ce que l'ajout des échantillons se fasse à distance des bandelettes. La plaque peut être inclinée et l'échantillon être ajouté à l'emplacement de collecte du tampon, à l'extrémité inférieure. Ceci permet d'éviter la formation de points sombres liée au dépôt de l'échantillon sur la bandelette.

19. Éviter de conserver les réactifs et les échantillons dans un congélateur auto-dégivrant.

INSTRUCTIONS DE CONSERVATION

1. Conserver la trousse HTLV BLOT 2.4 de MPD et ses composants entre 2 et 8°C en dehors des périodes d'utilisation.
2. Lorsqu'ils sont conservés entre 2°C et 8°C, tous les réactifs et toutes les bandelettes restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur la trousse. Ne pas congeler les réactifs.

A. **Bandelettes à antigènes**
   - Éviter toute exposition inutile des bandelettes à antigènes à la lumière.

B. **Réactifs**
   - Les réactifs doivent être conservés dans les flacons ou bouteilles d'origine, dont le bouchon doit être en place.
   - Verser tous les réactifs encore froids et les replacer entre 2°C et 8°C pour conservation dès que possible.
   - Un précipité peut se former lorsque le substrat est conservé entre 2°C et 8°C. Ceci n'a aucune incidence sur le fonctionnement la trousse.

ATTENTION: Éviter toute exposition inutile du substrat à la lumière.

COLLECTE, TRANSPORT ET CONSERVATION DES PRÉLÈVEMENTS

Les échantillons sériques ou plasmatiques recueillis dans l'EDTA, l'héparine ou le citrate de sodium peuvent être utilisés. Avant de les stocker, vérifier que les caillots sanguins ou les cellules sanguines ont été séparés par centrifugation.

Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C si le test est pratiqué dans les 7 jours suivant le prélèvement et congelés à -20°C ou température inférieure si le test est pratiqué après plus de 7 jours. Il est préférable d'utiliser des prélèvements clairs, non hémolysés. Les échantillons extrêmement lipémiques, ictériques ou contaminés (par des particules) doivent être filtrés (0,45 µm) ou centrifugés avant le test.

Le sérum des patients peut être inactivé mais ceci n'est pas indispensable au fonctionnement optimal du test.

Pour l'inactiver, procéder comme suit :
1. Retirer le couvercle du récipient contenant le sérum.
2. Chauffer le sérum à 56°C pendant 30 minutes au bain-marie.
3. Laisser refroidir le sérum avant de refermer le couvercle.
4. Le sérum peut être congelé pour être conservé jusqu'à l'analyse.

Il est déconseillé de soumettre le sérum du patient à des cycles répétés de congélation-décongélation.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE NÉCESSAIRE NON FOURNI AVEC LA TROUSSE

- Eau désionisée ou distillée
- Gants jetables
- Un plateau à bascule (offrant une vitesse de basculement allant de 2 à 16 oscillations par minute et un angle d'inclinaison de 5 à 10 degrés afin de permettre un lavage homogène des membranes)
- Pipetteurs et embouts de contenance appropriée
- Aspirateur avec collecteur à l'hypochlorite de sodium
- Bain-marie à 56°C (facultatif)
- Hypochlorite de sodium pour la décontamination

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. TAMPON DE LAVAGE DILUÉ
   (a) Le TAMPON DE LAVAGE DILUÉ doit être **préparé juste avant utilisation.**
   (b) Diluer 1 volume de TAMPON DE LAVAGE CONCENTRÉ (20X) dans 19 volumes d'eau de qualité réactif. Bien mélanger.

2. TAMPON DE BLOTTING
   (a) Reconstituer chaque bouteille de TAMPON DE STOCKAGE LYOPHILISÉ à l'aide de 100 ml d'eau de qualité réactif. Bien mélanger pour dissoudre. Le TAMPON DE STOCKAGE RECONSTITUÉ ainsi obtenu reste stable pendant 6 semaines s'il est conservé entre 2 et 8°C.
   (b) Le TAMPON DE BLOTTING doit être **préparé juste avant utilisation.** Ajouter 1 g de POUDRE DE BLOTTING pour chaque volume de 20 ml de TAMPON DE STOCKAGE RECONSTITUÉ préparé à l'étape 2(a) ci-dessus. Mélanger afin de garantir la dissolution totale de la poudre.
   (c) Mélanger à nouveau avant de verser.

3. SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL
   Remarque : Préparer la solution dans un bécher / récipient en polypropylène.
   (a) La SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL doit être **préparée juste avant utilisation.**
   (b) Préparer la SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL en diluant le CONJUGUÉ à 1/1000 dans le TAMPON DE BLOTTING (par exemple, 10 µl de CONJUGUÉ dans 10 ml de TAMPON DE BLOTTING).

4. SOLUTION DE SUBSTRAT (prête à l'emploi)
   (a) Verser directement le volume nécessaire depuis la bouteille. Utiliser une pipette propre. Veiller à bien reboucher après utilisation.

PROCÉDURE

Remarque : a) Aspirer tous les produits chimiques et réactifs utilisés dans un collecteur contenant de l'hypochlorite de sodium.

b) Toutes les incubations doivent être effectuées sur un plateau à bascule.

Attention :

Certains échantillons entraînent l'apparition de marques sombres à l'endroit où ils sont déposés sur la bandelette. Pour éviter ce problème, veiller à procéder comme suit :-

i. L'échantillon ne doit être déposé qu'une fois le TAMPON DE BLOTTING ajouté.

ii. Incliner légèrement la plaque en en soulevant l'extrémité supérieure ou inférieure. Le tampon de blotting s'écoule alors jusqu'à l'extrémité inférieure de la plaque. Déposer l'échantillon à l'emplacement où le tampon de blotting est recueilli. Une fois tous les échantillons déposés, remettre la plaque à plat. Veiller à ce que les bandelettes restent humides en permanence au cours de l'opération.

iii. Si l'utilisateur ne souhaite pas incliner la plaque, il lui est également possible de déposer les échantillons à l'extrémité supérieure ou inférieure du puits. Ainsi, l'apparition éventuelle de marques sombres n'empêcherait pas la lecture des résultats sur la bandelette.

Marche à suivre :

1. À l'aide de pinces, extraire avec précaution le nombre nécessaire de BANDELETTES du tube et les disposer, face numérotée vers le haut, dans chaque puits. Placer des bandelettes pour les contrôles positif fort, positif faible et négatif.
2. Ajouter 2 ml de TAMPON DE LAVAGE DILUÉ dans chaque puits. **2 ml**
3. Incuber les bandelettes pendant au moins 5 minutes à température ambiante (25 ± 3°C) sur un plateau à bascule (à une vitesse de 12 à 16 oscillations par minute). Éliminer le tampon par aspiration. **5 minutes**
4. Ajouter 2 ml de TAMPON DE BLOTTING dans chaque puits. **2 ml**
5. Ajouter 20 µl de sérum du patient, ou autant de contrôle, dans les puits appropriés. **20 µl**
6. Recouvrir la plaque avec le couvre-plaque fourni et incuber pendant 1 heure à température ambiante (25 ± 3°C) sur le plateau à bascule. **60 minutes**
7. Retirer le couvre-plaque avec précaution de façon à éviter d'éclabousser ou de mélanger les échantillons. Incliner la plaque pour aspirer le mélange des puits. Changer l'embout de l'aspirateur à chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée.
8. Laver chaque bandelette à 3 reprises avec 2ml TAMPON DE LAVAGE DILUÉ en laissant tremper pendant 5 minutes sur le plateau à bascule entre chaque lavage. **3 x 2 ml**
9. Ajouter 2 ml de SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL dans chaque puits. **2 ml**
10. Couvrir la plaque et incuber pendant 1 heure à température ambiante (25 ± 3°C) sur le plateau à bascule. **60 minutes**
11. Aspirer le CONJUGUÉ dans les puits. Laver comme indiqué à l'étape 8. **3 x 2 ml**
12. Ajouter 2 ml de SOLUTION DE SUBSTRAT dans chaque puits. **2 ml**
13. Couvrir la plaque et incuber pendant 15 minutes sur le plateau à bascule. **15 minutes**
14. Aspirer le SUBSTRAT et rincer les bandelettes à au moins trois reprises à l'aide d'eau de qualité réactif afin d'arrêter la réaction. **3 x 2 ml**
15. À l'aide de pinces, placer délicatement les bandelettes sur du papier absorbant. Couvrir avec le papier absorbant et sécher. Il est également possible de laisser les bandelettes sécher dans les cupules de la plaque.
16. Fixer les bandelettes sur une feuille de résultats (papier blanc non absorbant). Ne pas appliquer de ruban adhésif au niveau des bandelettes révélées. Examiner les bandelettes (voir l'interprétation des résultats) et reporter les résultats. Pour les stocker, maintenir les bandelettes dans l'obscurité.

RÉSUMÉ DES PROCÉDURES DE TEST

Réactifs	Quantités	Durées
Bandelette de nitrocellulose	1	-
Tampon de lavage	2 ml	5 min
Tampon de blotting	2 ml	-
Prélèvement	20 µl	60 min
Tampon de lavage	3 x 2 ml	3 x 5 min
Conjugué	2 ml	60 min
Tampon de lavage	3 x 2 ml	3 x 5 min
Substrat (prêt à l'emploi)	2 ml	15 min
Eau distillée	3 x 2 ml	-

QUANTITÉ DE RÉACTIF NÉCESSAIRE SELON LE NOMBRE DE BANDELETTES

Réactifs	NOMBRE DE BANDELETTES UTILISÉES						
	3	6	9	15	20	27	36
Tampon de lavage 1X (ml)	60	100	140	240	300	400	520
Tampon de blotting 1X (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Conjugué (µl)	11	17	23	35	45	59	77
Substrat (ml)	11	17	23	35	45	59	77
Poudre de blotting (g)	1	2	3	4	5	6	8

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé de recourir au contrôle négatif et aux deux contrôles positifs forts à chaque test quel que soit le nombre d'échantillons testés. Pour que les résultats obtenus à l'issue d'un test soient valables, les conditions suivantes doivent être remplies :

1. **CONTROLE NÉGATIF**
   Aucune des bandes virales HTLV-I/II spécifiques, rgp46-I, rgp46-II ou GD21, ne doit apparaître sur la bandelette de contrôle négatif. La bande correspondant au contrôle du dépôt sérique (anti-IgG humaine) doit être visible.

2. **CONTRÔLE POSITIF FORT I**
   La bande de contrôle du dépôt sérique et toutes les bandes HTLV-I/II pertinentes fonction des poids moléculaires doivent apparaître. Les bandes HTLV-I pertinentes devant être présentes sont les bandes p19, p24, gp46, rgp46-I et GD21. Remarque : la bande gp46 est diffuse.

3. **CONTRÔLE POSITIF FORT II**
   La bande de contrôle du dépôt sérique et toutes les bandes HTLV-I/II pertinentes fonction des poids moléculaires doivent apparaître. Les bandes HTLV pertinentes devant être présentes sont les bandes p24, GD21 et rgp46-II.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La bande de contrôle sérique permet de s'assurer du dépôt du sérum lors du test. L'absence de cette bande signale qu'aucun sérum, conjugué ou substrat de test n'a été déposé sur la bandelette de test ou que d'autres erreurs de manipulation ont été commises.

Localiser et identifier les bandes apparaissant sur les bandelettes portant les contrôles positifs forts. Ces bandelettes servent ensuite à identifier les bandes présentes sur les bandelettes portant les prélèvements à tester.

PROFIL DE L'ÉCHANTILLON	INTERPRÉTATION
1. Aucune réactivité aux protéines spécifiques du HTLV	SÉRONÉGATIF
2. Réactivité à la protéine GAG (p19 accompagnée ou non de p24) <u>et</u> à deux protéines ENV (GD21 et rgp46-I)	SÉROPOSITIF AU HTLV-I
3. Réactivité à la protéine GAG (p24 accompagnée ou non de p19) <u>et</u> à deux protéines ENV (GD21 et rgp46-II)	SÉROPOSITIF AU HTLV-II
4. Réactivité aux protéines GAG (p19 et p24) <u>et</u> ENV (GD21) <u>*-SÉROPOSITIVITÉ AU HTLV-I indiquée par p19 ≥ p24*</u> <u>*-SÉROPOSITIVITÉ AU HTLV-II indiquée par p19 < p24*</u>	SÉROPOSITIF AU HTLV*
5. Bandes spécifiques au HTLV détectées mais critères de séropositivité au HTLV-I, HTLV-II ou HTLV non remplis. Les profils de bandes indéterminés suivants peuvent toutefois être interprétés comme indiquant une SÉRONÉGATIVITÉ: - *Profil HTLV-I GAG par Western Blot indéterminé (PHGI) Présence des p19, p26, p28, p32, p36, p53 mais absence de la p24 et de toute protéine ENV.* - *Toute combinaison de protéines GAG (p19, p26, p28, p32, p36, p53) mais absence de la p24 et de toute protéine ENV.* - *Toute protéine GAG isolée (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53)*	INDÉTERMINÉ**

* Les cas de séropositivité au HTLV dont le type n'a pu être défini peuvent être résolus à l'aide de l'algorithme de *Wiktor* et al en l'absence des rgp46-I et rgp46-II. L'efficacité de cet algorithme, qui s'appuie sur la réactivité relative des p19 et p24, dans le cadre de la différenciation des deux sérotypes a été montrée.[7,11,12,13,14]

** L'interprétation indéterminée est fondée sur les recommandations de l'OMS de 1990.[15] Cependant, plusieurs études ont indiqué que certains profils indéterminés de bandes (comme répertoriés) pourraient être interprétés comme des résultats séronégatifs, en particulier chez les donneurs de sang sains.[16-25] Par exemple, une étude portant sur 37 724 donneurs de sang sains a confirmé que les profils PHGI pouvaient être interprétés sans risque comme étant séronégatifs.[26] Il convient toutefois d'être prudent lorsque des profils indéterminés sont obtenus chez des consommateurs de drogue par voie IV, des donneurs de sang issus de zones endémiques ou des patients atteints de pathologies neurologiques.[26,27]

L'infection double du sérum d'un sujet est possible, bien que rare, et peut également être différenciée d'après les critères ci-dessus. Le profil de bandes d'un prélèvement de ce type indiquera une réaction positive au HTLV-I et au HTLV-II. Les informations disponibles montrent que la séropositivité aux rgp46-I et rgp46-II est respectivement spécifique au HTLV-I et au HTLV-II. Par conséquent, les sérums réactifs aux rgp46-I, rgp46-II, GD21, p19 et p24 peuvent être classés parmi les cas d'infection double.

LIMITES DE LA MÉTHODE

Le fonctionnement optimal du test n'est possible que dans le respect absolu du mode opératoire décrit. Le non-respect de ce mode opératoire peut entraîner l'obtention de résultats aberrants.

L'obtention d'un résultat NÉGATIF ne permet pas d'exclure la possibilité d'une exposition au HTLV-I ou au HTLV-II, ou d'une infection par ces virus. Les Blots INDÉTERMINÉS ne doivent pas être utilisés comme base pour le diagnostic de l'infection par le HTLV-I/II.

Une séropositivité à la p19 comme à la p24 a également été observée au sein de populations non infectées à faible risque bien que les fluctuations liées à la p24 soient relativement rares.

La sensibilité de la rgp46-I a été évaluée à 95 % en France, à 100 % pour les échantillons confirmés par ACP en Jamaïque et aux États-Unis et à 98 % chez les donneurs de sang séropositifs au HTLV-I. Il a été montré que la sensibilité de la rgp46-II s'élevait à plus de 98 % sur les échantillons confirmés par ACP aux États-Unis.

Le sensibilité globale de chacun des déterminateurs de type, rgp46-I et rgp46-II, est estimée supérieure à 97 %. Les rares échantillons HTLV-I et HTLV-II ne réagissant pas à la rgp46-I ou à la rgp46-II sont réactifs au minimum à la GD21 et à une ou plusieurs bandes GAG, p19, ou p24, et remplissent ainsi les critères de séropositivité au HTLV (profil 4) ou d'indétermination (profil 5). Aucune interprétation faussement négative n'a été relevée.

Il peut être utile de procéder à un test complémentaire de type ACP (HTLV-I et HTLV-II) afin de dissocier les échantillons séropositifs au HTLV pour lesquels le test HTLV BLOT 2.4 de MPD n'a pu identifier s'il s'agissait d'une infection par le HTLV-I ou le HTLV-II (i.e. profil 4).

CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE FONCTIONNEMENT

Les performances du test HTLV BLOT 2.4 de MPD, destiné à la détection des anticorps dirigés contre les virus HTLV-I et HTLV-II, ont été évaluées à l'aide de prélèvements séropositifs et séronégatifs au HTLV-I/II, puis comparées à deux tests de dépistage comprenant des antigènes HTLV- I et HTLV-II (protéines ou peptides recombinants).

Sensibilité

Des prélèvements positifs aux anticorps HTLV-I et/ou HTLV-II, découlant de tests commerciaux ELISA, ont été utilisés afin de déterminer la sensibilité des tests HTLV BLOT 2.4 de MPD.

A. Comparaison à un test LIA 1

Voici les résultats de la comparaison entre le test HTLV BLOT 2.4 de MPD et un test LIA 1, pour des échantillons positifs acquis auprès de Boston Biomedica, Inc., États-Unis (BBI) et ProMedDx :

Méthode		Test LIA 1		Total
		NÉG / IND	POS	
HTLV BLOT 2.4 de MPD	NÉG / IND	3*	0	3
	POS	0	102	102
	Total	3	102	105

* Le test HTLV BLOT 2.4 de MPD donne 2 résultats indéterminés et 1 résultat négatif. Le test LIA 1 conclut à 3 résultats négatifs.

Les deux tests ont établi les discriminations suivantes pour les 102 échantillons positifs au HTLV:

Méthode	Interprétation				Total
	HTLV-I	HTLV-II	HTLV-I et HTLV-II**	Indéterminé***	
HTLV BLOT 2.4 de MPD	45	53	4	0	102
LIA 1	48	51	0	3	102

** Apparition des marqueurs spécifiques à la fois au HTLV-I et HTLV-II, indiquant une coïnfection.

*** Impossible de déterminer les souches HTLV en raison de l'absence de marqueurs spécifiques.

Les tests HTLV BLOT 2.4 de MPD et LI 1 ont donné des résultats similaires. Les discordances sont dues à l'utilisation de différents antigènes immobilisés et de méthodes différentes.

Le test HTLV BLOT 2.4 de MPD a montré une sensibilité de 97,1 %, égale à celle obtenue par le test LIA 1.

B. Comparaison à un test LIA 2

Un panel anti-HTLV-I et II de la Société Française de Transfusion Sanguine (SFTS-94) composé de 26 échantillons HTLV-1 et 6 échantillons HTLV-II a été analysé. Les résultats du test HTLV BLOT 2.4 de MPD obtenus dans le cadre de ce panel ont été comparés à un test LIA 2. Les voici :

Méthode	Interprétation				Total
	HTLV-I	HTLV-II	Indéterminés	Faux NÉG	
HTLV BLOT 2.4 de MPD	26	6	0	0	32
LIA 2	21	6	4	1	32

Le test HTLV BLOT 2.4 de MPD a correctement identifié les échantillons positifs au HTLV, établissant une sensibilité supérieure à 99,9 % pour ce panel. Dans les mêmes conditions, le kit comparatif (LIA 2) a généré une sensibilité de 96,9 %.

Spécificité

200 échantillons provenant de donneurs de sang ont été testés. Résultat de spécificité : 92,5 %. 15 échantillons n'ont pas pu être déterminés et aucun résultat faux positif n'a été détecté.

En ajoutant 150 prélèvements cliniques, 50 de grossesse, 50 potentiellement infectieux (10 prélèvements ictériques, hémolytiques, triglycéridiques, lipémiques, protéiniques) et 73 à réactivité croisée potentielle (TB, *Helicobactor pylori*, HEV, dengue, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2), la spécificité globale atteint 89,2 % (461/517). 56 échantillons n'ont pas pu être déterminés et aucun résultat faux positif n'a été détecté. 6 échantillons ont été confirmés par un autre test comme étant vrais positifs.

LIMITES DE GARANTIE

Le fabricant ne garantit la trousse de test que pour un usage diagnostique *in vitro* sous réserve que soient respectées les spécifications et limites décrites dans le mode d'emploi du produit et que celui-ci soit utilisé conformément aux présentes instructions. Le fabricant décline toute responsabilité, explicite ou implicite, y compris celle, implicite ou explicite, liée à la qualité marchande, l'aptitude à l'emploi ou l'adéquation implicite à une autre fin particulière. Le fabricant ne peut s'engager que sur un remplacement ou un remboursement du produit. Le fabricant ne peut être tenu responsable par l'acheteur ou toute autre partie d'aucune détérioration, blessure ou perte financière résultant de l'utilisation du produit.

PROBLÈMES TECHNIQUES / RÉCLAMATIONS

Dans l'éventualité d'un problème technique / d'une réclamation, procéder comme suit :

1. Noter le numéro de lot de la trousse et la date de péremption.
2. Conserver les trousses et et les résultats obtenus.
3. Contacter le bureau MP Biomedicals le plus proche ou votre distributeur local.

BIBLIOGRAPHIE

1. Towbin H., Staehlin T. and Gordan J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1976; 76: 4350-4354.

2. Poiesz BJ., Ruscetti FW., Gazdar AF., Bonn PA., Minna JD. And Gallo RC. Detection and Isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980; 77(12): 7415-7419.

3. Kalyanaraman VS., Sarngadharan MG., Robert-Guroff M., Miyoshi I., Blayney D., Golde and Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218: 571-573.

4. William AE., Fang CT., Slamon DJ. et al. Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. Science 1988; 240: 643-646.

5. Lee H., Swanson P., Shorty VS., Zack JA., Roseblatt JD. and Chen ISY. High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. Science 1989; 244: 471-475.

6. Lipka JJ., Bui K., Reyes GR, Moeckli R., Wiktor SZ., Blattner WA., Murphy EL., Hanson CV., Shaw GM., Shinsky JJ. and Foung SKH. Determination of a unique immunodominant epitope of HTLV-I. Infect Dis 1990; 162: 353-357

7. Wiktor SZ., Alexandra SS., Shaw GM. et al. Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by Western Blot. Lancet 1990; 335: 1533.

8. Samuel KP., Lautenberger JA., Jorcyk CL., Josephs S., Wong Staal F. and Papas TS. Diagnostic potential for human malignancies of bacterially produced HTLV-I envelope protein. Science 1984; 226: 1094-1097.

9. Hadlock KG., Goh CJ., Bradshaw PA., Perkins S., Lo J., Habbaz RK., Kaplan J. and Foung SKH. Delineation of an immunodominant and highly HTLV specific epitope within the HTLV-I transmembrane glycoprotein. Blood 1995; 68(4): 1392-1399.

10. Varma M., Rudolph D., Knuchel M., Switzer W., Hadlock KG., Velligan M., Chan L., Foung SKH., Lal RB. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of HTLV-I and HTLV-II infection by Western Blot assay containing recombinant envelope glycoproteins. J. Clin. Micro. 1995; 33(12): 3239-3244.

11. Lillehoj EP., Alexander SS., Dubrule CJ., Wiktor S., Adams R., Thi, A. Manns CC., and Blattner WA. Development and evaluation of a human T-Cell leukemia virus type I serologic confirmatory assay incorporating a recombinant envelope polypeptide. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2653-2658.

12. Lal RB., Brodine SK., Coligan JE., and Roberts CR. Differential antibody responsiveness to p19 gag results in serological discrimination between human T-lymphotropic virus type I and type II. J. Med. Virol. 1991; 1: 232-236.

13. Hjelle B., Cyrus S., Swenson S., and Mills R. Serologic distinction between human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and HTLV type II. Transfusion 1991; 31: 731-736.

14. Madeleine, MM., Wiktor SZ., Goedert JI., Manns A., Levine PH., Biggar RJ., Blattner WA. HTLV-I and HTLV-II worldwide distribution: reanalysis of 4 832 immunoblot results. Inte. J. Cancer 1993.; 54(2): 255-260.

15. World Health Organization's Global Programme on AIDS. WHO Global Programme on AIDS Information Update. Virus Information Exchange Newsletter 1990; 7(2): 54-55.

16. Lal, RB., Rudolph DL., Coligan JE., Brodine SK., and Roberts CR. Failure to detect evidence of human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and type II in blood donors with isolated gag antibodies to HTLV-I/II. Blood 1992; 80: 544-550.

17. Khabbaz, RF., Heneine W., Grindon A., Hartley TM., Shulman G., and Kaplan J. Indeterminate HTLV serologic results in U.S. blood donors: Are they due o HTLV-I or HTLV-II? J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1992; 5: 400-404.

18. Lipka, JJ., Young KK., Kwok SY., Reyes GR., Sninsky JJ, and Foung SK. Significance of human T-lymphotropic virus type I indeterminant serological findings among healthy individuals. Vox Sang. 1991; 61: 171-176.

19. Zrein M., Louwagie J., Boeykens H., Govers L., Hendickx G., Bosman F., Sablon E., Demarquilly C., Boniface M., and Saman E. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. Clin. Diag. Lab. Immunol. 1998; 5: 45-49.

20. Witt DJ., Kuramoto K., Kemper M., and Holland P. Utility of prospective study of donors deferred as HTLV indeterminate. Vox Sang. 2000; 78:130-131.

21. Hayes C.G., Burans JP., and Oberst RB. Antibodies to Human T Lymphotropic virus Type I in a population from the Philippines: Evidence for cross-reactivity with *Plasmodiun falciparum*. The J. Infect. Dis. 1990; 163: 257-262.

22. Gallo D., Diggs JL., and Hanson CV. Evaluation of two commercial Human T-Cell Lymphotropic Virus Western blot (Immunoblot) kits with problem specimens. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2046-2049.

23. Garin B., Gosselin S., de The G., and Gessain A. HTLV-I/II infection in a high viral endemic area of Zaire, Central Africa: Comparative evaluation of serology, PCR, and significance of indeterminate Western blot pattern. J. Med. Virol. 1994; 44: 104-109.

24. Fujiyama C., Fujiyoshi T., Matsumoto D., Yashiki S., Tamashiro H., and Sonoda S. Re-evaluation of anti-HTLV-I Western blot assay using HTLV-I and HTLV-II serum panels. Clin. & Diag. Virol. 1995; 4: 149-161.

25. Rouet F., Meertens L., Courouble G., Herrmann-Storck C., Pabingui R., Chancerel B., Abid A., Strobel M., Mauclere P., and Gessain A. Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus type I - seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 1247-1253

26. Cesaire R., Bera O., Maier H., Lezin A., Martial J., Ouka M., Kerob-Bauchet B., Ould Amar AK., and Vernant JC. Seroindeterminate patterns and seroconversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. Transfusion 1999; 39: 1145-1149.

27. Soldan SS., Graf MD., Waziri A., Flerlage AN., Robinson SM., Kawaninshi T, Leist TP., Lehky TJ., Levin MC., and Jacobson S. HTLV-I/II seroindeterminate western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. J. Infect. Dis. 1999; 180: 685-694.



MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapour 118259
Tél. : + 65 6775 0008
Fax : + 65 6775 4536
Courriel : enquiry_ap@mpbio.com



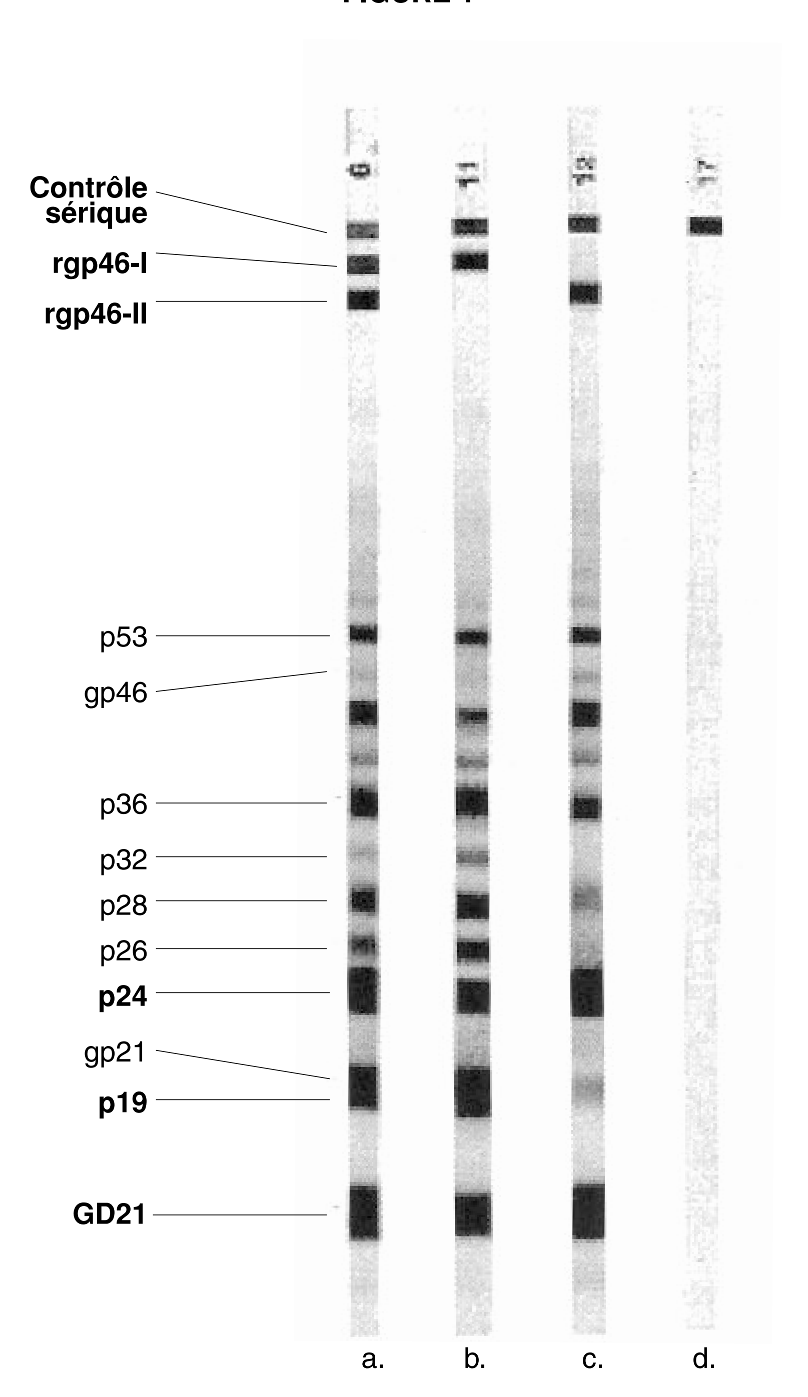
Medical Technology Promedt
Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Allemagne
Tél. : + 49 68 94 58 1020
Fax : + 49 68 94 58 1021
Courriel : info@mt-procons.com

Bureaux régionaux :

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aeroport
P.O. Box 1015
1211 Genève 5
Suisse
Tél. : (4122) 788-1908
Fax : (4122) 788-1986
Courriel : mpbiosuisse@mpbio.com

* Brevet États-Unis	5 066 579 ; 5 614 366 ; 5 763 572 ; 5 814 441 ; 5 871 933 ; 5 643 714
* Brevet Australie :	613350 ; 667189 ; 690540
* Brevet Canada :	1337799
* Brevet Europe :	0395634
* Brevet Japon :	2559482

FIGURE 1



Bandes spécifiques au virus visualisées à l'aide de :

a. Un sérum à double infection par les HTLV-I et II
b. Contrôle positif fort I (réactif au HTLV-I uniquement)
c. Contrôle positif fort II (réactif au HTLV-II uniquement)
d. Contrôle négatif